



УДК 543.544

Хроматографические свойства Арбидола® и количественное определение его примесей методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии

Голубицкий Г.Б., Куликов А.Л.

ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Курск

Поступила в редакцию 11.01.2012 г.

Аннотация

Изучено удерживание Арбидола® на хроматографических сорбентах разных типов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ в широком интервале рН подвижной фазы. Показаны преимущества использования щелочной подвижной фазы. Изучены условия разделения основного вещества, посторонних примесей и продуктов разложения. Разработана методика количественного определения примесей и продуктов разложения для контроля качества сырья на фармацевтическом предприятии.

Ключевые слова: обращенно-фазовая ВЭЖХ, удерживание Арбидола®, щелочная подвижная фаза, посторонние примеси, продукты разложения, контроль качества сырья

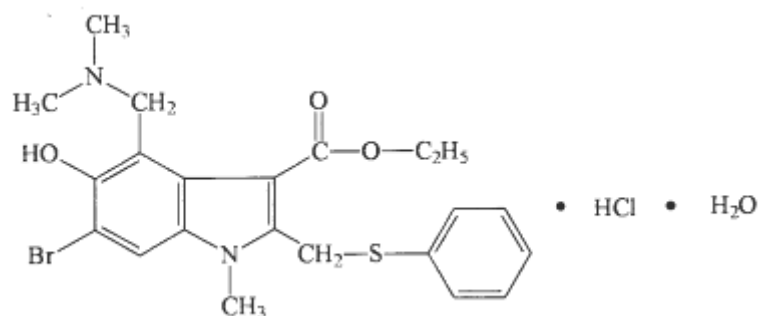
The retention of Arbidol® on chromatographic packings of different types by reversed-phase HPLC was examined. The advantages of alkaline mobile phase were shown. The resolution conditions of active substance, foreign impurities and destruction products were investigated. The method was worked out for quantitative determination of impurities and destruction products for raw material quality control at pharmaceutical plant.

Keywords: reversed-phase HPLC, Arbidol® retention, alkaline mobile phase, foreign impurities, destruction products, raw material quality control

Введение

Арбидол® (6-бром-1-метил-4-(диметиламинометил)-2-(фенилтиометил)-5-гидрокси-1Н-индол-3-карбоксикислоты этиловый эфир гидрохлорид моногидрат) – оригинальное лекарственное вещество, разработанное во всероссийском химико-фармацевтическом институте (ВНИХФИ), обладающее противовирусными свойствами, применяемое для лечения и профилактики гриппа.

Данное вещество описано в монографии Государственной Фармакопеи XII издания (ГФ XII) [1], где для определения содержания посторонних примесей предусмотрен метод ТСХ. Соответствующая методика анализа характеризуется недостаточными чувствительностью, эффективностью и точностью. В связи с этим было принято решение о разработке новой методики для контроля уровня примесей и продуктов разложения Арбидола® с использованием ВЭЖХ.



Теоретическая часть

При планировании работы рассматривали два возможных варианта анализа Арбидола® в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ: использование кислой (pH≈3) или щелочной (pH≈10÷11) подвижной фазы (ПФ). Преимущество первого варианта – использование колонок с наиболее распространенными типами сорбентов (C18, C8 или CN), стабильными в этих условиях, недостаток – невысокое удерживание Арбидола® – вещества основной природы и, как следствие, недостаточное разделение его пика с пиками примесей и продуктов разложения [2]. Известно о преимуществах хроматографического анализа оснований с использованием щелочных ПФ. Данный подход позволяет улучшить форму пика анализируемого вещества, поскольку при таких условиях его молекула переходит в нейтральную форму и значительно ослабляется ее взаимодействие с ионизированными силанольными группами сорбента. В то же время, гидрофобность нейтральной молекулы выше, в связи с чем ее взаимодействие с привитой фазой и удерживание сильнее, что положительно влияет на разделение анализируемых веществ [3]. Было принято решение исследовать оба варианта и выбрать оптимальный по характеристикам удерживания, разделения и формы пика Арбидола®.

Эксперимент

Использовали жидкостной хроматограф Waters Alliance 2695 с диодно-матричным детектором 2998. Разделение проводили на колонке размером 150×4,6 мм с защитной предколонкой размером 20×4,6 мм с сорбентом Zorbax SB CN с размером частиц 3,5 мкм и колонке размером 150×2,1 мм с защитной предколонкой размером 20×2,1 мм с сорбентом XTerra RP8 с размером частиц 5,0 мкм при температуре 40°C. Расход ПФ составил 0,5 мкл/мин, объем инжектируемой пробы 10 мкл. Для приготовления ПФ использовали сверхчистую воду из установки Direct Q5 (Millipore), ацетонитрил (gradient grade), трифторуксусную кислоту (for spectroscopy), ортофосфорную кислоту (reagent grade) – «Merck», Германия, калия дигидрофосфат (Reag. Ph. Eur.) – «Panreac», Испания. Для приготовления испытуемых растворов использовали Арбидол® фармацевтического качества (содержание 99,6 % в пересчете на сухое вещество) фирмы «Erregiere», Италия.

Для определения метрологических характеристик методики готовили 5 модельных растворов с разным уровнем содержаний характерных примесей А (6-бром-1-метил-2-(фенилтиометил)-5-гидрокси-1H-индол-3-карбоксикислоты этиловый эфир) и В (6,7-дибром-4-(диметиламинометил)-5-гидрокси-1-метил-2-

(фенилтиометил)-1Н-индол-3-карбоксикислоты этиловый эфир гидрохлорид). Количества примесей варьировали в диапазоне от 20 до 175 % от их ПДК в анализируемой субстанции. Концентрация Арбидола® в этих растворах была постоянной, равной 0,2 мг/мл. В качестве растворителя использовали ПФ. Эксперимент проводили в двух повторностях.

Обсуждение результатов

Для исследований с кислой ПФ была выбрана колонка с сорбентом Zorbax SB CN 3,5 мкм с привитыми нитрильными группами. На основании ранее проведенных исследований [4–6] было сделано предположение, что такой сорбент, позволяющий сблизить характеристики удерживания различных по гидрофобности веществ, обеспечит оптимальное разделение в изократических условиях. Кроме того, как показал предварительный эксперимент, колонка с более гидрофобным сорбентом Zorbax SB C8 3,5 мкм не позволяет получить пик Арбидола® с приемлемой для количественного анализа формой ($TF \approx 4,2$). TF (tailing factor) – фактор, характеризующий асимметрию пика согласно фармакопее США [7]. При переходе к полярному сорбенту наблюдали значительное улучшение: $TF \approx 1,9$ (рис. 1).

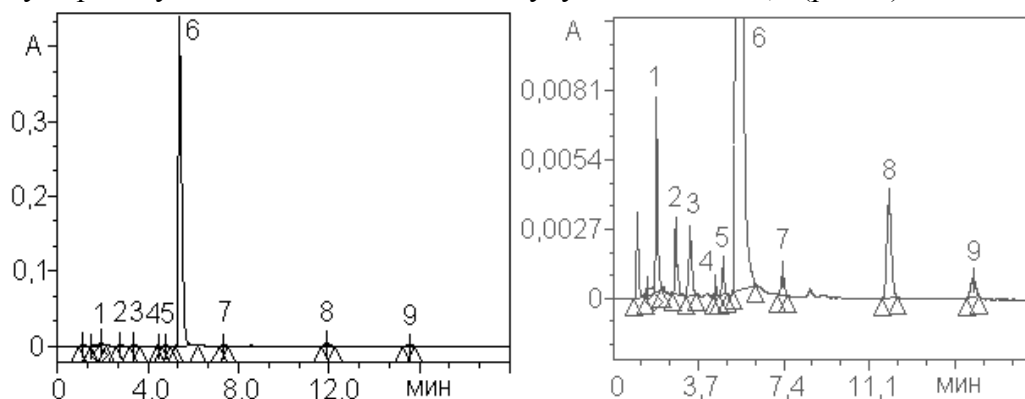


Рис. 1. Хроматограмма Арбидола® при 250 нм после нагревания раствора с рН 8,0 при 100°C в течение 30 мин. Колонка 150×4,6 мм + 20×4,6 мм Zorbax SB CN 3,5 мкм. ПФ (2:3) ацетонитрил–0,025М дигидрофосфат калия рН 3,0 (добавлена H_3PO_4). 1–5, 7–9–примеси (продукты разложения), 6–Арбидол®

Как было показано Хорватом и соавторами, амины – одни из наиболее эффективных агентов, маскирующих влияние остаточных силанольных групп сорбента на разделение оснований [8]. В связи с этим было сделано предположение, что замена фосфатного буфера на буферный раствор на основе триэтиламина (ТЭА) позволит снизить силанофильное взаимодействие и, таким образом, улучшить форму пика. Действительно, эта замена привела к уменьшению TF до 1,8. Нами было установлено, что для подкисления буферной составляющей ПФ эффективна трифторуксусная кислота (ТФК), поскольку при использовании уксусной или ортофосфорной кислот были получены пики Арбидола® с TF соответственно 2,0 и 2,4. Это можно объяснить так называемым хаотропным эффектом [9], который ведет к десольватации молекул Арбидола® и образованию ионных пар протонированная молекула основания – анион, причем влияние более объемного трифторацетат-иона сильнее.

Для работы со щелочной ПФ мы выбрали колонку с гибридным сорбентом XTerra RP8, устойчивым в интервале рН 1÷12. Для поиска оптимальных условий анализа была изучена зависимость удерживания Арбидола[®] от рН буферной составляющей ПФ (рис. 2). На соответствующей кривой наблюдаются две точки перегиба: при рН≈5,5 и при рН≈8,5. Можно предположить, что первая точка соответствует депротонизации азота пиррольного ядра, вторая – депротонизации азота группы $-N(CH_3)_2$.

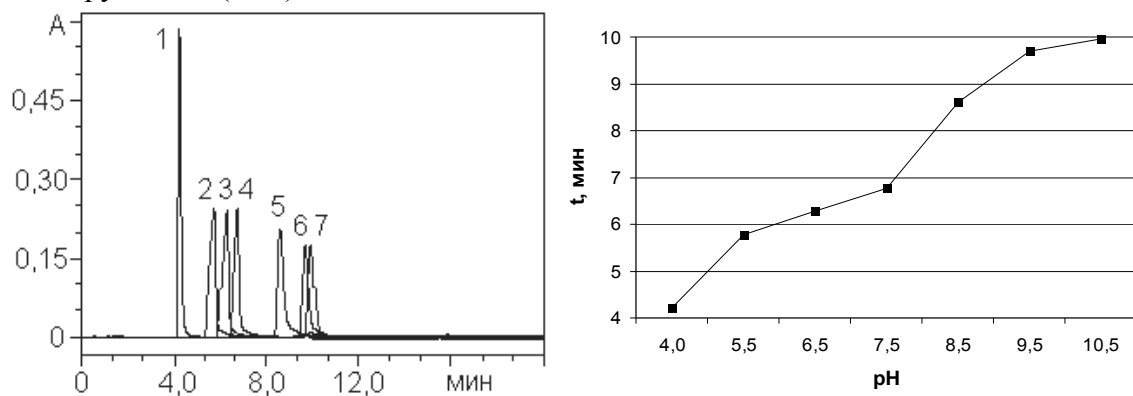


Рис. 2. Зависимость удерживания Арбидола[®] от рН буферной составляющей ПФ. Колонка 150×2,1 мм + 20×2,1 мм XTerra RP8 5,0 мкм. ПФ: (2:3) CH₃CN–0,6 % ТЭА+ТФК. λ = 315 нм. рН: 1–4,0; 2–5,5; 3–6,5; 4–7,5; 5–8,5; 6–9,5; 7–10,5

Полученные хроматографические характеристики приведены в табл. 1.

Таблица 1. Хроматографические характеристики Арбидола[®] при разных рН буферной составляющей подвижной фазы

рН	4,0	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	10,5
k	1.82	2.85	3.19	3.51	4.74	5.46	5.63
TF	1.40	0.85	0.91	1.09	1.98	1.56	1.27
N, т.т.	4516	1500	2077	3174	4912	5895	6433

Лучшие показатели соответствуют рН 10,5 буферной составляющей ПФ. Установлено, что снижение концентрации ТЭА до 0,4 % позволяет уменьшить TF до 1,09. Полученная хроматограмма приведена на рис. 3. Дальнейшее снижение до 0,3 % к улучшению формы пика не приводит (TF=1,15).

На рис. 4 а, б представлены нормализованные спектры Арбидола[®] и его примесей в ПФ при разных рН ее буферной составляющей. Изменение спектра при росте рН значительно, следовательно, депротонизация молекулы Арбидола[®] приводит к существенному перераспределению электронной плотности. Для одновременного детектирования Арбидола[®] и его примесей выбрана длина волны 250 нм, обеспечивающая оптимальное соотношение сигнал/шум.

Для подтверждения полноты разделения Арбидола[®], посторонних примесей и возможных продуктов разложения были приготовлены два раствора, в одном из которых вещество подвергли воздействию гидроксида натрия, в другом – перекиси водорода. По хроматограммам на рис. 5 и 6 видно, что механизм деструкции Арбидола[®] при этих условиях различен. Основное различие – характерный пик перекисного разложения со временем удерживания около 3,3 мин (рис. 6).

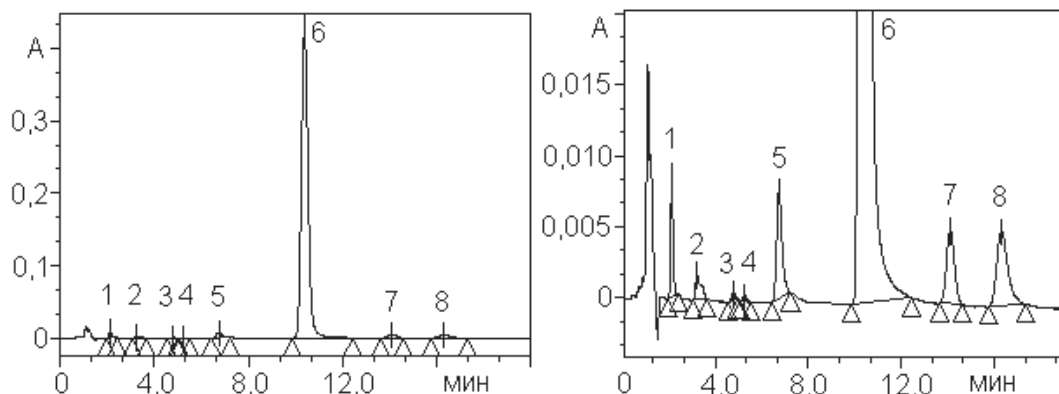


Рис. 3. Хроматограмма Арбидола® при 250 нм после нагревания его раствора с рН 8,0 в течение 60 мин при 100°C. Колонка 150×2,1 мм + 20×2,1 мм XTerra RP8 5,0 мкм. ПФ: (2:3) CH₃CN–0,4 % ТЭА+ТФК (рН 10,5).

1–5–неидентифицированные примеси, 6–Арбидол®, 7,8–примеси А и В соответственно (добавлены)

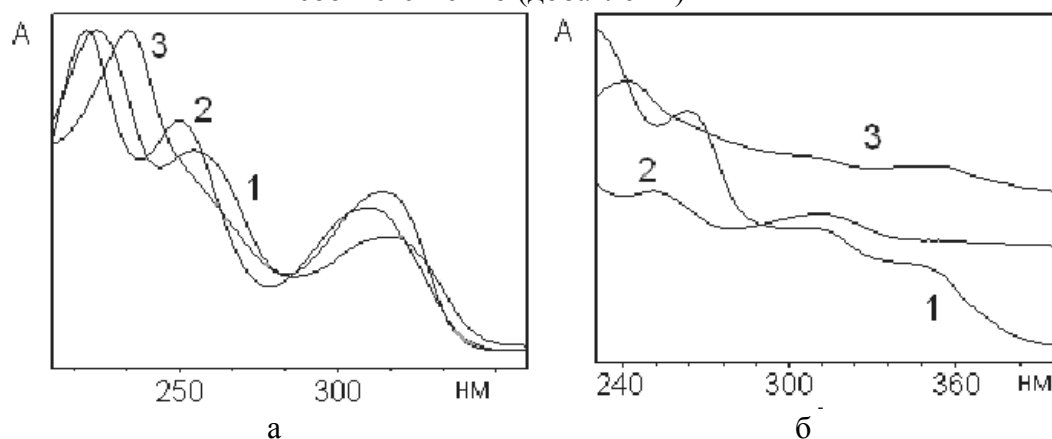


Рис. 4. а, б Нормализованные спектры поглощения Арбидола® (1) и его примесей А (2) и В (3) при рН 3,0 (а) и 10,5 (б)

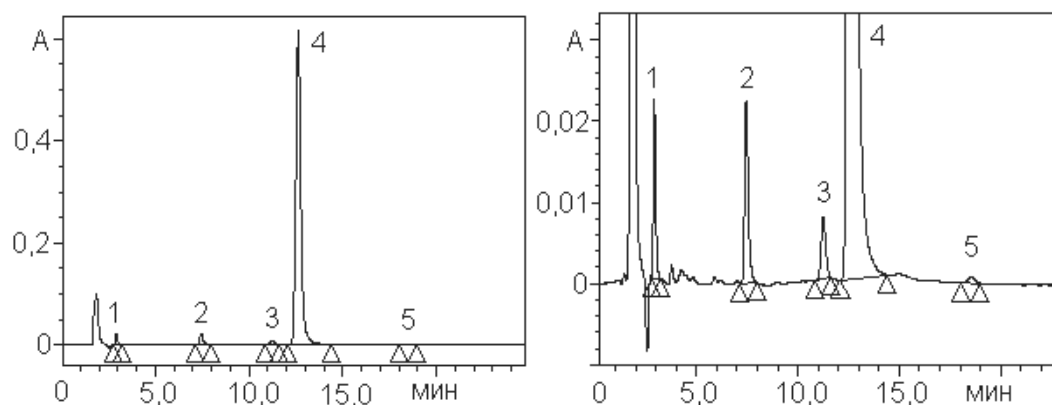


Рис. 5. Хроматограмма Арбидола® при 250 нм после нагревания раствора в течение 10 мин при 100°C (рН 14). Колонка 150×2,1 мм + 20×2,1 мм XTerra RP8 5,0 мкм. ПФ: (2:3) CH₃CN–0,4 % ТЭА+ТФК (рН 10,5). 1–3, 5–примеси (продукты разложения), 4–Арбидол®

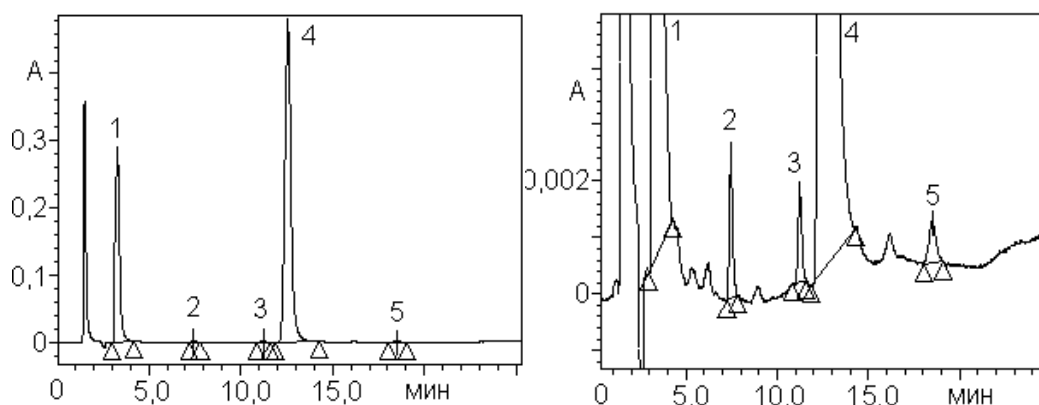


Рис. 6. Хроматограмма Арбидола® при 250 нм после нагревания в течение 5 мин при 100°C в смеси (1:1) CH₃CN–1,5 % H₂O₂. Колонка 150×2,1 мм XTerra RP8 5,0 мкм. ПФ: (2:3) CH₃CN–0,4 % ТЭА+ТФК (рН 10,5). 1–3, 5–примеси (продукты разложения), 4–Арбидол®

Установлено, что содержание этого продукта деструкции при хранении раствора в течение суток снизилось почти в 4 раза, что позволяет предположить, что это относительно нестабильная органическая перекись.

Определение метрологических характеристик. Модельные растворы анализировали при условиях, указанных в подписи к рис. 3, полученные хроматограммы интегрировали, рассчитывали результаты методом внутренней нормализации при помощи Excel и сравнивали введенные количества примесей с найденными по хроматограммам. Содержание примесей рассчитывали относительно Арбидола® с учетом коэффициентов отклика этих примесей относительно Арбидола®. Коэффициенты отклика $K_{A,B}$ определяли по хроматограммам модельных растворов и рассчитывали по формуле:

$$K_{A,B} = (S_{A,B} \times c_{ap}) / (S_{ap} \times c_{A,B}),$$

где $S_{A,B}$ и S_{ap} – площади пиков примеси А или примеси В и Арбидола® соответственно, мкВ×с, на хроматограмме; c_{ap} и $c_{A,B}$ – концентрации Арбидола® и примеси А или примеси В соответственно, мг/мл, в растворе.

В качестве предела определения c_{min} принимали такое содержание примеси, при котором относительная погрешность ее определения не превышала 10%, а соотношение сигнал/шум на хроматограммах не превышало 10.

Полученные метрологические характеристики представлены в табл. 2.

Таблица 2. Метрологические характеристики методики определения примесей в субстанции Арбидола®

Примеси	c_{min} , %	S_{max}	ε_{max} , %	$\varepsilon_{ср}$, %	$\Delta\varepsilon_r$, %	ε_{rmax} , %	r
А	0.05	2.99×10^{-3}	9.55	1.028	1.121	4.96	0.999
В	0.05	3.22×10^{-2}	9.01	1.323	2.249	-8.22	0.999

Для обеих примесей средние значения относительной погрешности $\varepsilon_{ср}$ меньше соответствующих доверительных интервалов $\Delta\varepsilon_r$, следовательно систематическая погрешность отсутствует. Величина коэффициента корреляции r свидетельствует о линейной зависимости площадей пиков примесей от их концентраций в изученном диапазоне концентраций.

Результаты анализа трех образцов субстанции представлены в табл. 3.

Таблица 3. Результаты определения посторонних примесей в субстанции Арбидола® (n=9; P=0,95)

Компоненты	ПДК, %	№ образца	$x_{\text{ср}}$	s	$S_{x_{\text{ср}}}$	$\Delta_{x_{\text{ср}}}$	ε , %
Примесь А	0.2	1	0.05	0.0010	0.0003	0.0008	1.54
		2	0.06	0.0020	0.0007	0.0015	2.57
		3	0.05	0.0010	0.0003	0.0008	1.54
Примесь В	0.5	1	0.08	0.0020	0.0007	0.0015	1.93
		2	0.10	0.0020	0.0007	0.0015	1.54
		3	0.08	0.0010	0.0003	0.0008	0.96
Неидент. примесь	0.2	1	0.07	0.0010	0.0003	0.0008	1.10
		2	0.09	0.0030	0.0010	0.0023	2.57
		3	0.10	0.0020	0.0007	0.0015	1.54
Суммарно	1.0	1	0.27	0.0040	0.0013	0.0031	1.14
		2	0.28	0.0050	0.0017	0.0039	1.38
		3	0.27	0.0040	0.0013	0.0031	1.14

Все субстанции соответствуют установленным требованиям по содержанию примесей. Результаты параллельных анализов воспроизводимы.

Заключение

Разработана экспрессная точная методика количественного определения посторонних примесей в субстанции Арбидола®, которая может быть рекомендована для включения в проект нормативной документации на субстанцию, а также использована при разработке методик анализа новых лекарственных форм Арбидола® – капсул и порошка для приготовления суспензии.

Список литературы

1. Государственная Фармакопея Российской Федерации. М: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. С. 502.
2. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В. и др. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. Воронеж: Водолей, 2004. С. 417–424.
3. Kirkland J.J., van Straten M.A., Claessens H.A.. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of basic compounds at pH 11 with silica-based column packings // J. Chromatogr. A. 1998. V. 797. N. 1 – 2. P. 111–120.
4. Голубицкий Г.Б., Будко Е.В., Иванов В.М. Удерживание компонентов таблеток «Пенталгин Н» в ВЭЖХ на сорбенте с привитыми нитрильными группами // Ж. аналит. химии. 2005. Т. 60. № 12. С. 1267–1272.
5. Голубицкий Г.Б., Будко Е.В., Басова Е.М. и др. Удерживание анальгина и анестезина на сорбентах разной полярности. Анализ таблеток «Беллалгин» методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журн. аналит. химии. 2007. Т. 62. № 2. С. 170–174.
6. Голубицкий Г.Б., Будко Е.В., Басова Е.М. и др. Хроматографическое разделение парацетамола, кофеина и аспирина на сорбенте с привитыми нитрильными группами и анализ таблеток «Аскофен П» // Журн. аналит. химии. 2007. Т. 62. № 6. С. 636–640.

7. USP30–NF25. The United States Pharmacopeia & National Formulary The United States Pharmacopeial Convention, 2006. Ch. 621.

8. Klaas E. Bij, Horváth Cs., Melander W. R., Nahum A. Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases // J. Chromatogr. 1981. V. 203. P. 65–84.

9. Kazakevich Y., LoBrutto R., Liu Y. et al. HPLC for pharmaceutical scientists. Edited by Y. Kazakevich, R. LoBrutto. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2007. P. 217–227.

Голубицкий Григорий Борисович – д.х.н.,
вед. инженер-химик отдела новых технологий
ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Курск

Куликов Александр Леонидович – вед.
химик лаборатории физико-химических
методов анализа отдела новых технологий ОАО
«Фармстандарт-Лексредства», Курск

Golubitskiy Grigoriy B. – doctor of sciences
(chemistry), The leading chemist-engineer of new
technologies departament of JSC “Pharmstandard-
Leksredstva”, Kursk,
e-mail: iirogig@narod.ru

Kulikov Aleksandr L. – The leading chemist of
physical & chemical methods of analysis
laboratory of new technologies departament of JSC
“Pharmstandard-Leksredstva”, Kursk